

中药胶囊剂中芍药苷含量测定方法优化

李婷婷, 陈子娇, 贾 薇, 曾元儿*

(广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006)

摘要: 目的 建立普遍适用于大多数胶囊剂中芍药苷的含量测定方法。方法 以胃康灵胶囊为例, 对中药胶囊剂中芍药苷的含量测定方法进行优化(包括提取方法、纯化方法及色谱条件等)。通过与药典方法测定的芍药苷含量进行比较, 确定筛选出的方法是否具有普遍适用性。结果 加水 25 ml 超声 30 min, 上聚酰胺柱并以水洗脱制得供试品溶液, 在流动相为乙腈-0.1%磷酸(15:85)条件下测定效果最佳。结论 通过验证可知, 新建立的方法简便、准确、灵敏、重现性好, 可普遍适用于大多数胶囊剂中芍药苷的含量测定。

关键词: 胶囊剂; 芍药苷; 高效液相色谱

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2014.10.019

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2014)10-2357-02

在药典中芍药苷的含量测定均采用 HPLC 法, 但各制剂中芍药苷的提取方法各异, 且提取溶剂各不相同, 基本上没有统一的供试品溶液制备方法^[1]。而且, 利用 HPLC 进行含量测定, 不同流动相会影响谱图、分离度、峰形等, 给科研工作带来一定的困难。因此, 本课题以胃康灵胶囊为例, 以高效液相色谱法测定芍药苷的含量, 单因素考察芍药苷的提取方法、净化方法, 并进行优化研究, 从而筛选出最佳提取方法和净化方法。然后再优化流动相, 对含量测定方法进行优化, 以致建立快速、简单、统一的中药制剂中芍药苷的含量测定方法。通过与药典方法测定的芍药苷含量进行比较, 确定筛选出的方法是否具有普遍适用性。从而建立普遍适用于大多数胶囊剂中芍药苷的含量测定方法, 为今后同剂型中成药中含量测定方法的建立以及其他剂型中成药中芍药苷的含量测定方法的优化工作提供一定的技术依据。

1 仪器与试剂

DIONEX P680 高效液相色谱仪, UVD 170U 紫外检测器, Chromleon 色谱工作站; HH-S 型恒温水浴锅(常州国立试验设备研究所); CQ-200 超声波清洗器(上海音波声电科技公司); BP211D 十万分之一电子天平(Sartorius 公司); 芍药苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 100337-200502); 乙腈、甲醇为色谱纯(科密欧公司); 水为超纯水; 其他试剂均为分析纯。实验药品见表 1。

表 1 实验药品

药名	厂家	批号
胃康灵胶囊	江西药都仁和制药有限公司	111105
血府逐瘀胶囊	天津宏仁堂药业有限公司	B03157
乳癖散结胶囊	陕西白鹿制药股份有限公司	120918
通心络胶囊	石家庄以岭药业股份有限公司	111106
心脑康胶囊	吉林省辉南辉发制药股份有限公司	20120701
八珍益母胶囊	江西南昌桑海制药厂	121144
桂枝茯苓胶囊	江苏康缘药业股份有限公司	100611
滋心阴胶囊	江西天施康中药股份有限公司	11090401

收稿日期: 2013-11-19; 修订日期: 2014-05-08

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划项目

(No. 201210572055)

作者简介: 李婷婷(1990-), 女(汉族), 广东新兴人, 广州中医药大学中药学院在读硕士研究生, 学士学位, 主要从事心血管疾病预防机制研究及新产品开发工作。

* 通讯作者简介: 曾元儿(1966-), 男(汉族), 江西新干人, 广州中医药大学教授, 博士学位, 主要从事中药质量标准研究工作。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent TC-C₁₈(4.6 mm×250 mm), 流动相为乙腈-0.1%磷酸(15:85), 流速 1 ml/min, 检测波长 230 nm, 进样量 10 μl。

2.2 对照品溶液的制备 取芍药苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每毫升含 70 μg 的溶液, 即得。

2.3 提取溶剂的考察 因《中国药典》2010 版中药胶囊剂中芍药苷的含量测定的提取溶剂不同, 因此在文献[2,3]研究的基础上提出对 30% 甲醇、50% 甲醇、70% 甲醇、80% 甲醇、甲醇、稀乙醇和水进行提取效率的考察。结果见图 1。

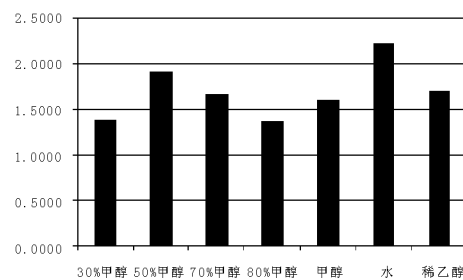


图 1 提取溶剂比较图

由上结果可以看出, 水对于芍药苷的提取效率是最高的, 因此将水作为中药胶囊剂中提取芍药苷的溶剂。

2.4 提取方式的考察 目前芍药苷的提取方式主要有超声提取法、回流提取法以及索氏提取法三种^[4,5]。但索氏提取法并未见报道于提取中药胶囊剂中的芍药苷^[6,7], 因此并未考察该方法。设定超声 30 min、加热回流 30 min、1 h 为考察对象。结果见图 2~3。

结果表明: 超声法对于芍药苷的提取效率比热回流法高, 且加热回流时间越长, 损失越大, 因此采用超声 30 min 的提取方式。

2.5 分离净化方法的考察 从《中国药典》及文献[8,9]中得知, 对于芍药苷的分离净化方法有正丁醇萃取法、氧化铝柱法、D101 型吸附树脂法、聚酰胺柱法, 因此以上述方法对中药胶囊剂中芍药苷进行分离净化。结果发现, 用正丁醇萃取损失较大; 通过 D101 型吸附树脂耗时久, 操作复杂; 氧化铝柱未能达到有效分离杂质; 对于杂质的分离用聚酰胺柱更优良, 因此确定方法为通过聚酰胺吸附树脂, 水洗脱, 收集洗脱液 60 ml, 蒸干, 残渣加稀乙醇溶解。

2.6 供试液制备最终方法 精密称取胶囊适量, 置具塞锥形瓶

中 精密加入水 25 ml 称定重量,超声提取 30 min,放冷,再称定重量,用水补足减失的重量,过滤,精密吸取 10 ml 续滤液,通过聚酰胺吸附树脂,水洗脱,收集洗脱液 60ml,蒸干,残渣加稀乙醇溶解至 10 ml。

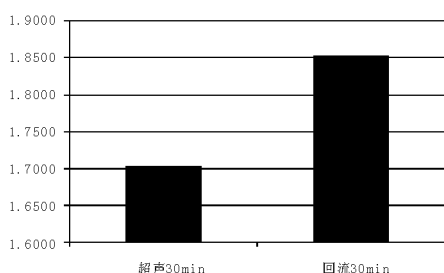


图2 提取方式比较图

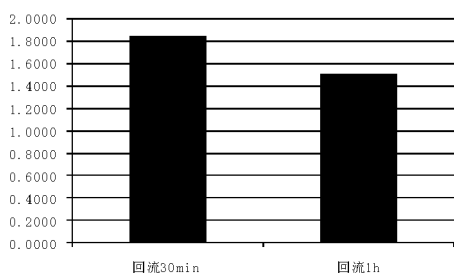


图3 提取时间比较图

2.7 流动相的考察 高效液相色谱法测定芍药苷的流动相多为甲醇-水、乙腈-水、甲醇-磷酸水、乙腈-磷酸水,还有一些流动相会加入一定的酸或缓冲溶液可减少拖尾,提高灵敏度,多少根据具体实验而定;加磷酸二氢盐能起到调节 pH 值和离子抑制剂的作用,一般能与其他组分达到基线分离^[10-21]。因此设定了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-磷酸水、乙腈-磷酸水等流动相进行不同比例的考察。结果表明:当在乙腈-0.1%磷酸(15:85)条件下测定时,芍药苷峰的理论板数最高,且不低于 2 000,分离度及拖尾因子符合 2010 年版《中国药典》(一部)附录规定的要求。因此确定流动相为乙腈-0.1%磷酸(15:85)。

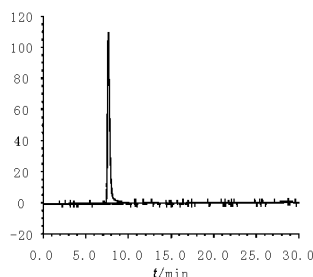
2.8 专属性试验 在相同条件下,分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液及阴性对照液各 10 μl,注入进样分析,色谱图见图 4,阴性无干扰,说明该实验方法的专属性较强。

2.9 线性关系考察 精密吸取对照品储备液 1 ml 2 ml 4 ml 6 ml 10 ml,分别置 10 ml 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀。分别精密吸取以上对照品稀释液各 10 μl,注入液相色谱仪,记录峰面积积分值。以峰面积 A 为纵坐标(Y),进样量(μg)为横坐标(X),得回归方程为 $Y = 87.238X + 0.3159$, $r = 0.9999$,表明芍药苷在 0.07196~0.71960 μg 范围内呈良好的线性关系。

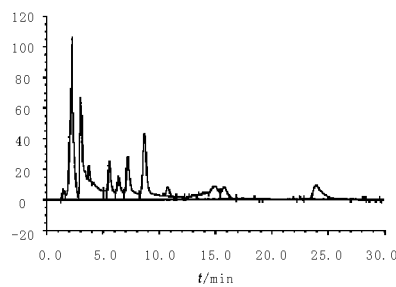
2.10 精密度试验 精密吸取浓度为 71.96 μg/ml 的芍药苷对照品溶液 10 μl,连续进样 5 次,结果芍药苷峰面积的 RSD 为 1.7%,说明仪器精密度良好。

2.11 重复性试验 精密称取同批胃康灵胶囊内容物约 0.3 g,按“2.6”项下的制备方法平行制备 5 份,分别精密吸取 10 μl,依法测定。用芍药苷的平均含量求出 RSD 为 1.4%,表明该方法重复性良好。

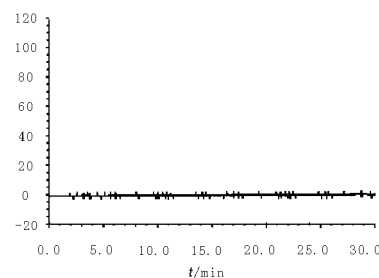
2.12 稳定性试验 取同一份供试品溶液,分别于 0,1,2,3,4 h 进样测定,记录峰面积。计算芍药苷的 RSD 为 1.2%,试验结果表明供试品在 4 h 内稳定。



A 对照品溶液



B 供试品溶液



C 阴性对照

图4 专属性验证图谱

2.13 方法可行性检验 采用新建方法对市面上购买的 8 种中药胶囊剂进行测定,所得结果与药典方法进行比较。结果见表 2。

表2 方法可行性检验结果

药品	方法	取样量/g	含量/mg·g ⁻¹
八珍益母胶囊	新建方法	0.3062	1.26
	药典方法	0.3005	1.35
桂枝茯苓胶囊	新建方法	0.1077	3.94*
	药典方法	0.1048	3.57
滋心阴胶囊	新建方法	0.1063	5.09*
	药典方法	0.1019	0.70
乳癖散结胶囊	新建方法	1.0087	0.20
	药典方法	1.0013	6.03
血府逐瘀胶囊	新建方法	0.5047	0.93
	药典方法	0.5049	1.18
心脑康胶囊	新建方法	0.5045	1.04*
	药典方法	0.5035	0.53
通心络胶囊	新建方法	0.2587	10.64*
	药典方法	0.2516	2.65
胃康灵胶囊	新建方法	0.3032	1.64*
	药典方法	0.3004	1.09

表中的* 表示新建方法优于药典方法

由上表可以看出,采用新方法进行含量测定时,桂枝茯苓胶囊、滋心阴胶囊、心脑康胶囊、通心络胶囊、胃康灵胶囊等 5 种胶囊所得结果优于药典方法,说明该方法可行。虽然采用新方法测定八珍益母胶囊和血府逐瘀胶囊中芍药苷的含量所得结果小于药典方法,但差异不大,可能为操作误差所致。而两种方法测定

的乳癖散结胶囊中芍药苷的含量相差大,可能是新方法不适用于乳癖散结胶囊,这方面工作还有待进一步研究。

3 讨论

通过对比药典方法与新建方法发现,新建方法的 HPLC 图的干扰小于药典方法的 HPLC 图,采用优化过的方法测定同剂型的其他成药中芍药苷含量大部分优于该成药的药典方法所得结果,少数成药采用新方法测定所得结果低于药典方法,但差别不大,可能为操作误差所致。可见,新建的方法普遍适用于大多数胶囊剂中芍药苷的含量测定。本研究可作为同剂型中成药新药中芍药苷的质量控制提供实验依据和方法思路,也可为其他剂型中成药中芍药苷的含量测定方法的优化工作提供一定的技术依据。

参考文献:

- [1] 曾元儿. 中国药典 2010 年版(一部) 化学成分分析简明手册[M]. 广州: 中山大学出版社, 2010: 72.
- [2] 吴基威, 朱锐金. 高效液相色谱法测定茵陈蒿汤中芍药苷的含量[J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17(11): 43.
- [3] 王孟良, 薛纯盛, 杨玉忠. 高效液相色谱法测定小儿泻速停颗粒中芍药苷的含量[J]. 中国实用医药, 2011, 6(19): 180.
- [4] 闫兴丽, 张建军, 李小燕. 温度对白芍药材、白芍提取物及乾坤清颗粒成品中芍药苷含量稳定性的影响[J]. 中草药, 2003, 34(2): 131.
- [5] 李捷玮, 金柔男, 李翔, 等. 多种中成药中芍药苷的含量测定[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(9): 1440.
- [6] 任建生, 马海泉, 蔡大伟. 芍药苷在复方中的定量分析研究进展[J]. 时珍国医国药, 2010, 12(8): 746.
- [7] 杜志谦, 王广强, 薛素娟. 芍药苷检测在中药质控中的应用[J]. 时珍国医国药, 2002, 13(9): 554.
- [8] 杨凤梅, 王慧春. 乌鸡白凤丸中芍药苷薄层层析的几种提取方法比较分析[J]. 青海医药杂志, 2001, 31(11): 51.
- [9] 杨士友, 孙备, 黄世福, 等. 白芍中芍药苷提取和纯化工艺的研究[J]. 安徽医药, 2004, 8(1): 21.
- [10] 李越峰, 任彦冬, 杨武亮, 等. 不同产地白芍芍药苷含量的测定和比较研究[J]. 长春中医药大学学报, 2005, 21(4): 28.
- [11] 刘瑾, 倪嘉纳, 刘力, 等. 不同产地白芍的质量分析[J]. 时珍国医国药, 2004, 15(4): 207.
- [12] 王诚元, 陈伟. 不同产地白芍芍药苷含量研究[J]. 湖南中医杂志, 2007, 23(3): 98.
- [13] 胡建煌, 梁煜霞. 不同产地白芍中芍药苷含量比较[J]. 临床医学工程, 2009, 16(2): 89.
- [14] 李霄, 艾萍. RP-HPLC 双波长法测定白芍中芍药苷和五没食子酰葡萄糖含量[J]. 北京中医药大学学报, 2009, 32(2): 122.
- [15] 葛志伟, 贺庆, 林云径, 等. RP-HPLC 法测定杭白芍及其饮片芍药内酯苷、芍药苷和苯甲酰芍药苷[J]. 中草药, 2008, 39(3): 378.
- [16] 王巧, 刘荣霞, 毕开顺, 等. HPLC 法测定白芍总苷胶囊中芍药内酯苷、芍药苷和苯甲酰芍药苷[J]. 中草药, 2005, 36(11): 1630.
- [17] 蒋国强, 杨水新, 叶勇. RP-HPLC 法测定生白芍免煎饮片芍药苷[J]. 中草药, 2007, 38(8): 1190.
- [18] 林爱琴, 蒋建霞. HPLC 测定健胃消炎颗粒中芍药苷的含量[J]. 中国医药导报, 2010, 7(3): 54.
- [19] 胡轶娟, 浦锦宝, 王爱贵, 等. 高效液相法测定白芍药材中芍药总苷的含量[J]. 医学研究杂志, 2008, 37(8): 104.
- [20] 覃英镨, 莫武明. HPLC 法测定小儿泻痢片中芍药苷的含量[J]. 中国医药科学, 2011, 1(14): 134.
- [21] 刘莹, 王文, 魏海峰, 等. 正交分析法优化开郁胶囊中芍药苷的提取工艺[J]. 中国药师, 2001, 11(6): 620.

中药怀牛膝及黄芪对重型颅脑损伤大鼠 脑水肿及脑组织 AQP4 表达的影响

陆立和¹, 黄李平^{2*}

(1. 广西医科大学 2011 级中西医结合研究生班, 广西南宁 530021;
2. 广西医科大学第一附属医院, 广西南宁 530021)

摘要:目的 观察中药怀牛膝及黄芪对重型颅脑损伤大鼠脑组织含水量及水通道蛋白 4(AQP4) 表达的影响, 探讨其治疗重型脑损伤性脑水肿的机制。方法 SD 大鼠 65 只, 随机分为假手术组(5 只), 模型组(15 只), 怀牛膝治疗组(15 只), 黄芪治疗组(15 只), 怀牛膝及黄芪治疗组(15 只), 采用改良后 Feency's 方法建立大鼠重型颅脑损伤模型。分别在 1 天, 3 天, 7 天 3 个时间点每组各取 5 只测定脑组织含水量、HE 染色观察脑组织变化情况, 并采用免疫组化方法检测脑组织 AQP4 的表达。结果 模型组大鼠重型颅脑损伤后各时间点脑组织含水量、损伤灶周围 AQP4 的表达均高于假手术组($P < 0.05$), HE 染色观察发现模型组的脑组织肿胀水肿明显; 怀牛膝治疗组、黄芪治疗组各时间点脑组织含水量、AQP4 表达水平与模型组无明显降低($P > 0.05$), HE 染色观察发现与模型组基本一样; 怀牛膝及黄芪治疗组各时间点脑组织含水量、AQP4 表达水平均比模型组有降低($P < 0.05$), HE 染色观察发现与模型组相比, 脑组织水肿情况有所改善。结论 怀牛膝及黄芪治疗组可改善重型颅脑损伤后引起的脑水肿。其作用可能与抑制 AQP4 在损伤脑组织中的表达、减轻脑细胞损害有关。

关键词: 重型颅脑损伤; 脑水肿; 水通道蛋白 4; 牛膝; 黄芪; 大鼠

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2014.10.020

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2014)10-2359-03

收稿日期: 2013-12-04; 修订日期: 2014-06-06

基金项目: 广西自然科学基金(No. 2010GXNSFA013188)

作者简介: 陆立和(1985-), 男(壮族), 广西贵港人, 广西医科大学硕士研究生, 主要从事中西医结合脑病研究工作。

* 通讯作者简介: 黄李平(1956-), 女(汉族), 广西钦州人, 广西医科大学第一附属医院教授, 硕士研究生导师, 学士学位, 主要从事中西医结合临床工作。